

10.4322/rbcv.2017.032

## Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite em pó integral comercializado no estado de São Paulo, Brasil\*

### Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk powder commercialized in the state of São Paulo, Brazil

Carlos Eduardo Gamero Aguilar,\*\* Laryssa Freitas Ribeiro,\*\* Gabriel Augusto Marques Rossi,\*\* Higor Oliveira Silva,\*\* Ana Maria Centola Vidal,\*\*\* Oswaldo Durival Rossi Junior\*\*

#### Resumo

Objetivou-se verificar se as populações de *Bacillus cereus* presentes em leite em pó integral apresentam-se de acordo com a legislação vigente e também verificar diferença entre a presença desse microrganismo de acordo com o tipo de embalagem (lata e papel laminado). Para isso, foram adquiridas 40 amostras de leite em pó integral comercializadas no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Cerca de 20% das amostras analisadas continham populações de *B. cereus*. Entretanto, todas estavam dentro dos limites aceitos pela legislação. Não foi verificada diferença significativa quando analisadas as populações presentes entre as diferentes apresentações do produto. Conclui-se que todas as amostras avaliadas estavam de acordo com a legislação vigente e, portanto, não há problemas na comercialização de leite em pó integral na região avaliada.

**Palavras-chave:** laticínios, microbiologia de alimentos, saúde pública.

#### Abstract

This study focused on verify if *Bacillus cereus* counts in whole milk powder comply with current legislation and also check its presence in different types of package (milk powder canned and bag). To this, a set of 40 samples of whole milk powder was bought in the municipalitie of Ribeirão Preto, in the state of São Paulo, Brazil. About 20% of the samples contained *B. cereus* population. However, all the evaluated samples complied with current legislation. Statistical difference was not observed among the populations present in different types of package. So, we concluded that all the samples was according the current legislation and that there is no problems in the whole milk powder commercialiaed at this region.

**Keywords:** dairy, food microbiology, public health.

#### Introdução

O leite é considerado um dos alimentos mais nobres, devido à presença de nutrientes e vitaminas indispensáveis para manutenção da saúde humana (CALLEFE; LANGONI, 2015). Entretanto, devido a essa rica composição nutricional, torna-se susceptível à multiplicação de diversos microrganismos, que podem ser provenientes do próprio animal, do homem, do ambiente e dos utensílios utilizados durante a ordenha (ABDELKHALEK *et al.*, 2016).

Com o advento da pasteurização e dessecação extrema, mecanismos esses que visam conservar o leite (REZENDELAGO *et al.*, 2007), alguns microrganismos destacam-se como importantes agentes deteriorantes e patogênicos por permanecerem viáveis mesmo após o processamento do produto, como os esporos do *Bacillus cereus* (VIDAL *et al.*,

2016). Aliada a sua ampla distribuição ambiental, a presença deste já foi descrita em diversos derivados lácteos (VIDAL *et al.*, 2016; MEHDI *et al.*, 2016; FADDA *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2010; BARTOSZEWICZ *et al.*, 2008).

Outro fato importante é a capacidade das bactérias do gênero *Bacillus* de produzir enzimas deteriorantes, as quais causam lipólise e proteólise no leite podendo ocasionar problemas tecnológicos no produto (PINTO *et al.*, 2017). Além disso, produzem quatro toxinas responsáveis por distúrbios gastrointestinais (FDA, 2012), sendo que três relacionam-se com a ocorrência da síndrome diarreica (Hemolisina BL, Enterotoxina não hemolítica e Citotoxina) (BÖHM *et al.*, 2016) e uma com a síndrome emética a qual está relacionada com a ação de uma toxina pré-formada durante a esporulação dessa bactéria nos alimentos, conhecida por cereulide (FORGHANI *et al.*, 2014).

\*Recebido em 29 de maio de 2016 e aceito em 14 de setembro de 2017.

\*\*Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. Autor de correspondência: kadugamero@hotmail.com

\*\*\*Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

Com o intuito de definir a quantidade máxima permitida de *B. cereus* no leite em pó comercializado no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou os limites no produto disponível para o comércio através da RDC nº 12 (BRASIL, 2001). Para amostras indicativas, tolera-se até  $5,0 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>. Para amostragem representativa é estabelecido como padrão contagens de  $5,0 \times 10^2$  a  $5,0 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>.

Assim, o presente estudo objetivou verificar se as contagens de *B. cereus* em amostras de leite em pó comercializadas no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo atendem a legislação vigente e avaliar se existe diferença entre a ocorrência do microrganismo em diferentes apresentações comerciais do produto (lata e papel metalizado).

## Materiais e métodos

Foram avaliadas 40 amostras de seis marcas de leite em pó, cujas fabricações são supervisionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), adquiridas no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo entre os anos de 2010 e 2011. Foram utilizadas três marcas de maior valor comercial e três populares de acordo com o custo ao consumidor. As marcas populares (A, B e C)

Gram positivos, com esporo centro-terminal, foi considerado *B. cereus* as amostras positivas para as provas bioquímicas da catalase, prova da motilidade e redução de nitrato a nitrito, reação de Voges-Proskauer, prova da Fermentação anaeróbia da glicose, hemólise em sangue de carneiro e negativo para crescimento rizoide (APHA, 2001).

Foram realizadas análises estatísticas através do software MiniTab® de duas maneiras distintas. Primeiramente foi utilizado um esquema fatorial 2x2 para verificara possível influência do tipo de embalagem em uma mesma marca (marcas E e F, as quais possuem ambos tipos de embalagem). Posteriormente as marcas e apresentações foram comparadas pela análise de variância de um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições cada, a fim de verificar a possível existência de diferenças entre as marcas de maior custo ao consumidor e as populares em relação a quantificação de *B. cereus*, nas amostras reconstituídas imediatamente.

## Resultados e discussão

Os resultados das análises microbiológicas após as diluições realizadas do produto podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Populações de *B. cereus* em amostras de leite em pó integral adquiridas no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo imediatamente após reconstituição do leite

Marca / Amostra	A (papel) (UFC.g <sup>-1</sup> )	B (papel) (UFC.g <sup>-1</sup> )	C (papel) (UFC.g <sup>-1</sup> )	D (lata) (UFC.g <sup>-1</sup> )	E (lata) (UFC.g <sup>-1</sup> )	E (papel) (UFC.g <sup>-1</sup> )	F (lata) (UFC.g <sup>-1</sup> )	F (papel) (UFC.g <sup>-1</sup> )
1	0 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{1a}$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	$2 \times 10^{1a}$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{1a}$
3	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{1a}$	$1 \times 10^{1a}$	0 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{1a}$	0 <sup>a</sup>
4	$1 \times 10^{1a}$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{1a}$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Populações seguidas de letras iguais não diferem do ponto de vista estatístico ao nível de 5% de significância (Tukey)

possuíam embalagens constituídas por papel metalizado, a marca D embalagem tipo lata, enquanto as demais (E e F) ambos os tipos de embalagens (lata e papel metalizado), totalizando 8 tratamentos.

Após a assepsia das embalagens, foram pesadas 25g de cada amostra, e em seguida transferido para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225mL de água peptonada 0,1% esterilizada. A partir desta diluição inicial foram preparadas diluições decimais até  $10^{-3}$ , empregando-se o mesmo diluente (ICMSF, 1983). De todas as diluições do leite em pó reconstituído foram imediatamente retiradas amostras para proceder-se o isolamento e a quantificação do *B. cereus*.

Posteriormente a retirada das amostras, foi realizado o plaqueamento seletivo em ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MOSSEL *et al.*, 1967). As placas foram incubadas a 30°C por 18-40 horas e, ao final do período, as colônias sugestivas de bactérias do grupo *B. cereus* foram repicadas em ágar soja triptona. Após incubação (30°C/24 horas), foram realizados esfregaços para coloração de Gram e de Wirtz-Concklin. Confirmada a presença de bastonetes

Quando a alíquota foi colhida logo após a reconstituição do produto, apenas uma amostra de cada marca analisada (20 %) apresentou populações de *B. cereus*. Apesar de todas as marcas apresentarem populações para a referida bactéria, todas estão abaixo do limite conferido pela RDC nº12 (BRASIL, 2001), não havendo problemas em sua comercialização.

Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre as marcas analisadas, ou seja, não é possível afirmar que o material em que o leite em pó é acondicionado para posterior comércio (lata e papel laminado) tenha influência nas populações presentes de *B. cereus*.

Os resultados obtidos no presente estudo são diferentes do que foram observados em pesquisa realizada no município de São Paulo em 1987 e 1988, em que os autores encontraram 2,78% das amostras de leite em pó impróprias para o consumo conforme a legislação (BARROS *et al.*, 2001). Tal diferença pode ser explicada, em partes, pela existência atual da Instrução Normativa nº62, a qual tornou mais rigorosos os limites máximos de contaminantes do leite cru no Brasil (BRASIL, 2011).

Além da obtenção higiênica da matéria prima, as condições de processamento e contaminação pós tratamento térmico influenciam na qualidade microbiológica do leite em pó (ABDELKHALEK *et al.*, 2016). Em vista disso, programas de auto controle foram obrigatoriamente implementados nos estabelecimentos industrializadores de produtos de origem animal sob supervisão do Serviço de Inspeção Federal desempenhando um importante papel na prevenção de possíveis contaminações no produto que possam ocorrer no interior dos laticínios (BRASIL, 1997), contribuindo assim para a manutenção atual da qualidade microbiológica dos produtos, diferentemente do que ocorria anterior a essa.

Mesmo em populações baixas, como os encontrados no presente estudo, os níveis de *Bacillus cereus* devem ser monitorados, principalmente em produtos que sofreram tratamentos térmicos. Através da esporulação, tais bactérias podem resistir a temperaturas elevadas, diferentemente de outros microrganismos patogênicos, tornando assim o meio menos competitivo e com maior disponibilidade de nutrientes (VIDAL *et al.*, 2016). Sendo assim, quando o ambiente em que o esporo está presente é alterado de forma a propiciar sua germinação, a bactéria pode se multiplicar e atingir níveis de contaminação capazes de provocar danos à saúde dos consumidores, representando risco à saúde pública (ICMSF, 1983).

Quando o leite em pó é reconstituído com água e mantido em temperaturas entre 20 e 30°C, a germinação dos esporos do *B. cereus* pode ocorrer e consequentemente atingir níveis que consistem em risco à saúde pública após 10 horas, sem que ocorram alterações organolépticas perceptíveis no produto (RODRIGUEZ; BARRET, 1986). A segurança do leite em pó

reconstituído depende da temperatura de estocagem, uma vez que essa temperatura afeta não só a multiplicação bacteriana como também a competição da microbiota presente no mesmo (BARROS *et al.*, 2001).

Outro aspecto de importância é o fato de grande parte dos consumidores de leite em pó possuírem algum tipo de comprometimento imunológico, sejam eles demasiadamente jovens ou idosos, tornando-os mais susceptíveis a infecções de um modo geral, mesmo quando agentes patogênicos encontram-se em populações menores (DI PINTO *et al.*, 2013), o que também demonstra a importância de eliminar tal contaminante do produto.

Diante da dificuldade em eliminar o *B. cereus* quando o mesmo encontra-se presente em leite em pó, a adoção de práticas no início da cadeia produtiva e durante a industrialização do produto que impeçam ou reduzam a contaminação se faz necessária. A aplicação de programas de auto controle na indústria, associadas a Boas Práticas de Ordenha na bovinocultura de leite é uma alternativa para minimizar os riscos de contaminação nas diferentes etapas do processo de produção, sendo capaz de reduzir a contaminação bacteriana, inclusive pelo *B. cereus* (VALLIN *et al.*, 2009), e propiciando assim produtos de melhor qualidade microbiológica aos consumidores.

## Conclusão

Conclui-se que a qualidade microbiológica do leite em pó integral comercializado no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo é considerada adequada conforme os limites aceitáveis, independente da forma de apresentação comercial das mesmas (papel metalizado ou lata).

## Agradecimentos

À FAPESP, pelo aporte financeiro para a realização da presente pesquisa (Processo nº 2009/09059-2), ao primeiro autor.

## Referências

ABDELKHALEK, A.; ELSHERBINI, M.; ELETRIBY, D.; SADAK, A. Quality assessment of imported powder milk at Mansoura city, Egypt. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, Vol 3 No 1, Pages 75-78., March 2016.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: *American Public Health Association*, 676 p, 2001.

BARROS, M.R.M.de; PANETTA, J.C.; MIGUEL, O. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na capital do estado de São Paulo, Brasil – 1987/1988. *Revista de Educação Continuada*, v.4, n.1, p.45-51, 2001

BARTOSZEWICZ H., HANSEN B. M., SWIECICKA I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology*, v.25, p.588-96, 2008.

BÖHM, M.E.; KREY, V.M.; JEßBERGER, N.; FRENZEL, E.; SCHERER, S. Comparative Bioinformatics and Experimental Analysis of the Intergenic Regulatory Regions of *Bacillus cereus* hbl and nhe Enterotoxin Operons and the Impact of CodY on Virulence Heterogeneity. *Frontiers in Microbiology*, v.7, p. 768, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria da SDA/DIPOA, n. 368, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 8 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 29 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC n.12, 2 de janeiro de 2001. Revoga Portaria n.451, de 19 de setembro de 1997. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2 jul.1998. art. 4º, p.1-48, 2001.

CALLEFE, J.L.R.; LANGONI, H. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. *Veterinária e Zootecnia*, v.22(2), p.151-162, 2015.

DI PINTO, A.; BONERBA, E.; BOZZO, G.; CECI, E.; TERIO, V.; TANTILLO, G. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. *European Food Research and Technology*, v.237, p.275–279, 2013.

FADDA, A.; DELOGU, A.; MURA E.; NOLI A. C.; PORQUEDDU G.; ROSSI M. L.; TERROSU G. Presenza di *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae* in ricotta fresca e salata: controlli ufficiali nel periodo 2009 – 2012. *Italian Journal of Food Safety*, v.1 n. 5, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). The Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Center for Food Safety & Applied Nutrition*. Acesso em 24 de Mai. Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornellnessContaminants/UCM297627.pdf>>, 2012

FORGHANI, F.; KIM, J.; OH, D. Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin- and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 11, 2014.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. Microorganismos de los alimentos. I. *Técnicas de análises microbiológicas*, 2.ed., Zaragoza: Acríbia, p.431, 1983.

MEHDI, K.; HASSAN, H.; MEHDI, G.; EBRAHIM, R. Detection of Enterotoxin Genes Profile of *Bacillus cereus* in Pasteurized and Sterile Milk, Baby Food and Dairy Products. *International Medical Journal*, Vol. 23 Issue 2, p110-113. 4p, April, 2016.

MOSSEL, D.A.A. *et al.* Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Applied Microbiology*, v.15, n.3, p.650-653, 1967.

PINTO, C. L.O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.26(3): p.645-651, jul.-set. 2006.

PINTO, C.L.O.; SOUZA, L.V.; MELONI, V.A.S.; BATISTA, C.S.; SILVA, R.; MARTINS, E.M.F.; CRUZ, A.G.; MARTINS, M.L. Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, volume 70, 2017.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI JR, O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; AMARAL, L.A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.6, p.1563-1569, 2007.

RODRJGUEZ, M.H.; BARRET, E. L. Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk. *Journal of Food Protection*, n. 49, p. 680-6, 1986.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009.

VIDAL, A. M. C. ; ROSSI-JUNIOR, O. D. ; ABREU, I. L. ; BÜRGER, K. P. ; CARDOSO, M. V. ; GONÇALVES, A. C. S. ; ROSSI, G. A. M. ; D'ABREU, L. F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Ciência Rural*, v.46, no.2, 2016.

ZHOU, G.; ZHENG, D.; DOU, L.; CAI, Q.; YUAN, Z. Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *International Journal of Food Microbiology*, v. 137, p. 143–146, 2010.